배양된 사람 코점막 상피세포의 분화에 따른 씨알릭산의 발현

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실, 마산 삼성병원*
서경식 · 김경수 · 최진우* · 윤주헌 · 이정권

= Abstract =

Expression of Sialic Acids according to the Differentiation of Cultured Human Nasal Epithelial Cells

Kyung Sik Suh, M.D., Kyung Su Kim, M.D., Jin Woo Choi, M.D.,*
Joo-Heon Yoon, M.D., Jeung Gweon Lee, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
Department of Otorhinolaryngology, Masan Samsung Hospital, Masan, Korea*

Background : Sialic acid residues are known to play a key role in the normal function of the glycoconjugates. Recently, with the development of specific sialic acid binding lectins such as Maackia seed agglutinin(MAA) and Sambucus nigra agglutinin(SNA), it has made easier to localize the sialic acid residues by the histochemical staining methods.

Objectives : We were to observe the expression of sialic acids according to the differentiation of cultured human nasal epithelial cells by the immunohistochemistry method using Wheat germ agglutinin(WGA), MAA, and SNA.

Materials and methods : Human nasal epithelial cell culture was done as floating method for the induction of differentiation. The cultured cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde and the epon 812 was used as embedding material. The immunohistochemistry was done as Lim's method.

Results : The WGA and MAA positive reactions were noted from the floating zero day through the fourteenth day. The reactions were positive to the squamous-like cells and differentiating cells(ciliated and secretory epithelial cells). The WGA binding patterns were homogeneous but MAA binding patterns were inhomogeneous. The SNA positive reaction was noted only in the fourteenth day and the reaction was inhomogeneous.

These results meant that N-acetyl glucosamine and N-acetyl neuraminic acid(α2,3) galactose were expressed from the floating zero day and N-acetyl neuraminic acid(α2,6) galactose was expressed from the floating fourteenth day.

Conclusion : N-acetyl neuraminic acid(α2,3) galactose may be more important to the primary defence of human nasal epithelial cell. Due to the inhomogeneity of the reaction, the further study using Lowicryl K4M will be needed. **(Korean J Otolaryngol 40 : 5, 1997)**

KEY WORDS : Sialic acid · Differentiation · Cultured human nasal epithelial cells.

논문접수일 : 1997년 2월 13일
심사통과일 : 1997년 4월 7일

서 론

씨알릭산은 neuraminic acid에서 변환된 20여종 이상의 유도체를 통털어 일컫는 말로써 점막하 선세포 및 상피층 배세포에서 생성되어 세포표면의 점액층으로 분비되는데, 이들중 N-acetyl neuraminic acid(NeuNAc)와 N-glycolyl neuraminic acid(Neu5Gc)가 가장 많은 형태로 알려져 있다[1)2)]. 이러한 씨알릭산이 복합당질 말단기에 존재하는 형태로는 O-glycosidic형 또는 N-glycosidic형 씨알릭 합성체가 있으며, 씨알릭산은 D-galactose나 N-acetyl-D-galactosamine에 α 2,3- 혹은 α 2,6- 결합으로 연결되어 있다[3)].

씨알릭산의 기능으로서 첫째, 음이온을 띄고 있어 각종 먼지를 흡착하여 점액에 의해 제거토록 할 수 있으며 둘째, 바이러스와 박테리아의 수용체로서의 기능이 있다[4)]. 이에 대한 예로 H1 hemagglutinin을 함유하는 인플루엔자 A 바이러스는 α 2,3 결합에 선택적으로 결합하며, H3 hemagglutinin을 함유하는 인플루엔자 A 바이러스는 α 2,6 결합에 결합한다[5)]. 셋째, α 2,3 결합이 α 2,6 결합보다 강하게 부착되어 있어 이들 구조의 양에 의해 점액의 점탄성이 조절된다고 한다[6)]. 이처럼 씨알릭산의 기능에서 α 2,3과 α 2,6 결합이 중요한 역할을 하며, 이 결합에 따라 씨알릭산의 기능이 상이하다는 것을 알 수 있다.

씨알릭산을 조직내에서 국소화 하는 방법으로 pH를 달리 함으로써 sialomucin과 sulphomucin을 구별하는 Alcian blue 염색을 이용하여 왔으나, 특이성이 떨어지는 문제점이 있었다. 최근에 α 2,3 결합 씨알릭산에 특이 렉틴인 Maackia amurensis(MAA)와 α 2,6 결합 씨알릭산에 특이적인 Sambucus nigra(SNA) 등이 개발되어 씨알릭산의 조직내 국소화에 대한 연구가 진행되고 있다[7)8)9)10)].

씨알릭산의 비점막 조직내 국소화에 대한 연구로, 권 등[11)]은 백서 비점막에 대한 연구에서 MAA는 후각점막에만 존재하며, SNA는 후각 및 호흡점막에도 존재한다고 하였으며, 이 등[12)]도 이와 유사한 결과를 보고하였다. 즉, 두 렉틴의 존재부위가 점막에 따라 상이함을 알 수 있었고, 이는 조직 및 부위에 따라 존재하는 씨알릭산의 종류가 다르다는 것을 의미한다 하겠다. 이처럼 씨알릭산은 α 2,3이나 α 2,6 결합에 따라 서로 상이한 기능 및 존재부위를 보인다.

Floating법으로 세포를 배양시 세포의 분화가 일어나며 형태학적으로 섬모 상피세포와 분비 상피세포로 구분이 가능하다. 그러나 세포의 분화에 따라 세포에 존재하는 씨알릭산의 발현이 어떤 양상을 보이는 지에 대한 보고는 아직 없는 실정이다. 이에 저자들은 사람 코점막 상피세포를 배양하여, 배양세포의 분화에 따라 α 2,3 혹은 α 2,6 결합을 하는 씨알릭산의 발현에 차이가 있는 지를 알아보고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 코점막 상피세포의 배양

부비동 수술과 비갑개 절제술중 채취한 사람 하비갑개 점막을 실험재료로 하여 세포배양을 하였으며, floating법을 이용하였다. 이를 약술하면, DMEM/F12 1 : 1 혼합 용액으로 0.1% pronase(type 14)를 만든 다음, 이 용액에 16 24시간 동안 4℃에서 처리하여 세포들을 유리시켰다. 유리된 상피세포를 항생제를 함유하는 DMEM/F12 용액으로 세척후 choleratoxin(10ng/ml, Sigma), retinoic acid(10^{-7} Mol, Sigma) 10% NU serum(Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA) 및 항생제를 포함하는 DMEM/F12 용액에 부유한 다음, 이를 플라스틱 배양용기에 평판하고 37℃에서 1시간 둔 후 용기에 부유액을 채취하여 원심분리하여 pellets을 얻어 배양액과 함께 콜라젠 겔위에 배양하였다. 콜라젠 겔은 type I 콜라젠 겔, 5×DMEM, 1 M $NaHCO_3$ 등으로 혼합하여 4℃에서 35mm 배양용기에 1.5ml 씩 넣은 후 37℃에서 30분간 굳힌 후 사용하였다. 배양은 5% CO_2, 95% air(37℃)에서 하였고 처음 배양액은 48시간 후에 갈아 주며, 그후 3~4일에 한번씩 갈아주어 합류를 이룰 때까지 위상차 현미경으로 관찰하였다.

콜라젠 겔위에서 배양되어 9 10일 후에 합류를 이룬 상피세포를 박리자를 이용하여 콜라젠 겔과 동시에

플라스틱 용기로부터 들어 올려 5ml 배양액을 넣은 60mm 배양용기에 옮겨 floating시켰다. 배양된 세포를 floating 당일, 7일째, 14일째에 2.5% glutaraldehyde에 6시간 고정후 epon 812에 포매하였다. 포매된 조직을 2μm의 두께로 절편을 만들어 면역조직화학 염색을 하였다.

2. 면역조직화학 염색

Epon 절편에 대한 면역조직화학 염색은 Lim등[13]의 방법을 이용하였다. 이를 간략히 기술하면, 조직절편을 포화 sodium ethoxide와 에탄올이 1 : 1로 혼합된 용액에 실온에서 20분간 탈 epon 처리후 에탄올에 수화시켰다. 다음 3% 과산화수소가 함유된 메탄올에 20분간 처리후 여과한 0.1mg/100ml liver acetone powder에 37℃에서 20분간 처리하였다.

씨알릭산에 반응을 하는 2종의 렉틴 MAA(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), SNA(EY Laboratories, San mateo, CA, USA)를 1 : 500으로 희석하여 높은 습도가 유지되는 용기에서 4℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음, avidin-biotin peroxidase complex(Elite PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 용액에 37℃에서 1시간 반응시킨 후, 3-amino-9-ethycarbazole로 실온에서 5분간 발색반응을 시켰다.

양성 대조군으로 1 : 500 WGA(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하였으며, 음성 대조군으로 렉틴대신 liver acetone powder(mouse, Sigma Co., St.louis, MO, USA) 용액을 사용하였다(Table 1). 염색표본에서 반응이 보이지 않는 경우를 음성(-), 반응을 보이는 경우를 양성(+)으로 정하여, Vanox-S형 광학현미경(Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 대조군의 면역조직화학 염색소견

양성 대조군인 WGA의 경우 floating 당일, 7일째, 14일째 모두에서 양성반응을 보였다. Floating 당일의 소견으로 편평상피양 세포(squamous-like cell)에서

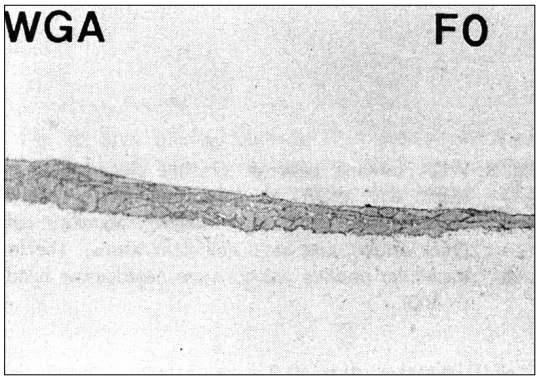

Fig. 1. WGA binding patterns. WGA shows homogeneously positive reactions to the squamous-like cells on the floating zero day(×100).

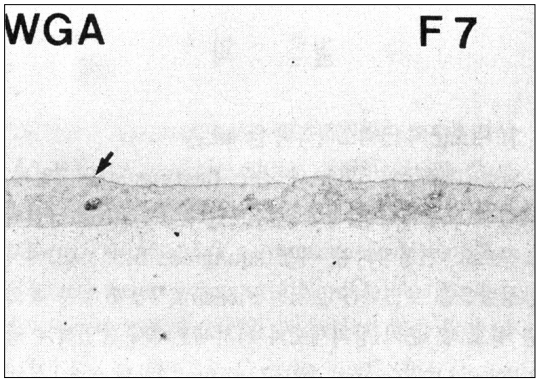

Fig. 2. WGA binding patterns. WGA shows homogeneously positive reactions to the cilia(arrow) and the differentiating cells on the floating seventh day(×100).

Table 1. Used lectins in this study

Lectin from	Common name	Specificity
Triticum vulgaris	Wheat germ(WGA)	N-acetyl glucosamine(GlcNAc) Sialic acid(Neu5Ac)
Maackia amurensis	Maackia seed(MAA)	Neu5Ac(α2,3)Gal
Sambucus nigra	Elderberry(SNA)	Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc

Gal : galactose, GalNAc : N-acetyl galactose

양성반응을 보였다(Fig. 1). Floating 7일째 일부 분화된 섬모 및 분비 상피세포와 기저세포에서 균일하게 양성반응을 보였다(Fig. 2). Floating 14일째 섬모, 분비 상피세포와 기저세포에서 세포 표면에 균일하게 양성반응을 보였으며, 일부에서는 세포내에서 양성반응을 보였다(Fig. 3). 음성 대조군인 liver acetone powder 용액의 경우 반응을 보이지 않았다(Fig. 4).

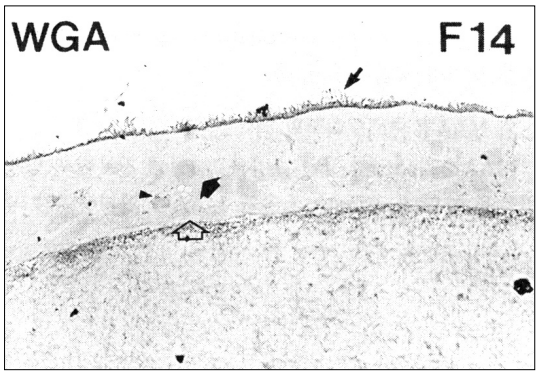

Fig. 3. WGA binding patterns. On the floating fourthteenth day, WGA shows homogeneously positive reactions to the cilia(thin arrow), secretory cell (thick arrow), and basal cell(blank arrow). The intracellular positive reactions are noted(arrow head)(×400).

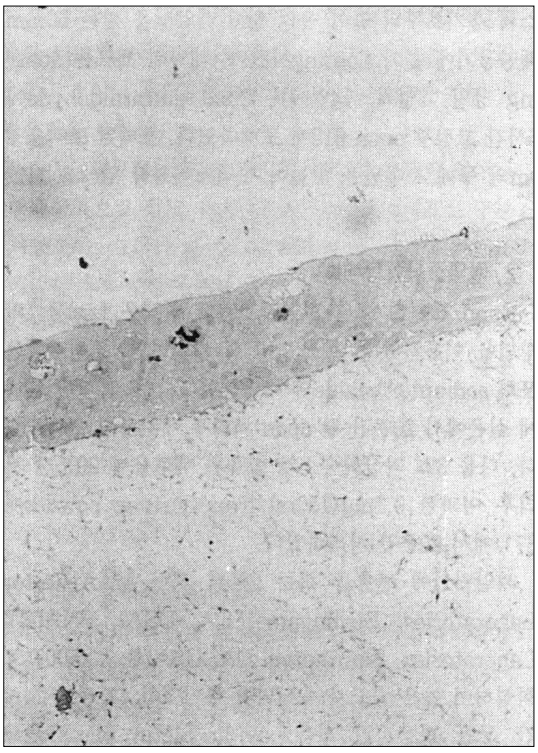

Fig. 4. Negative control of the study. Liver acetone powder solution shows thoroughly negative reaction to cells(×200).

2. MAA의 면역조직화학 염색소견

MAA는 floating 당일, 7일째, 14일째 전부에서 양성반응을 보였다. Floating 당일 MAA는 편평상피양 세포에서 균일하게 양성 반응을 보였고(Fig. 5), floating 7일째 일부 분화된 섬모 및 분비 상피세포에서 양성 반응을 보였다(Fig. 6). Floating 14일째 섬모, 분비 상피세포와 기저세포에서 양성 반응을 보였으나 일부에서는 반응을 보이지 않은 양상을 보여 비균일적으로 양성반응을 보였다(Fig. 7).

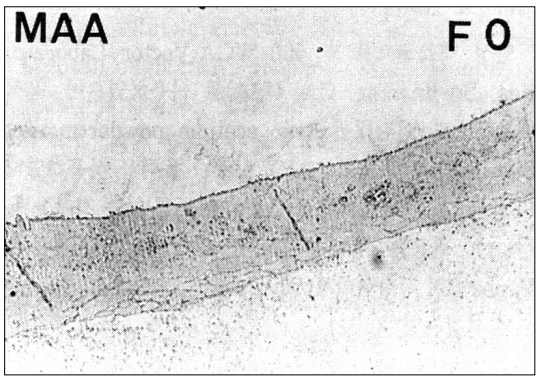

Fig. 5. MAA binding patterns. MAA shows homogeneously pasitive peactions to the squamous-like cells on the floating zero day(×400).

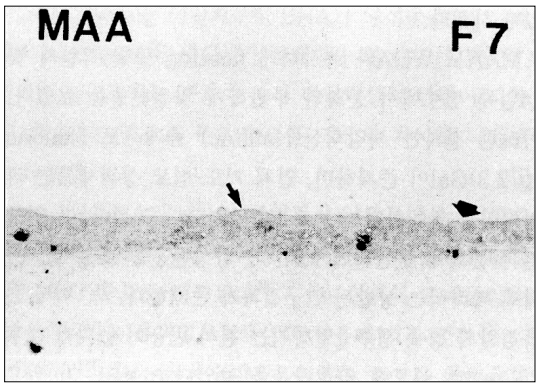

Fig. 6. MAA binding patterns. MAA shows inhomogeneously positive reactions on the floating seventh day. The positive reaction(thin arrow) and negative reaction(thick arrow) are noted(×100).

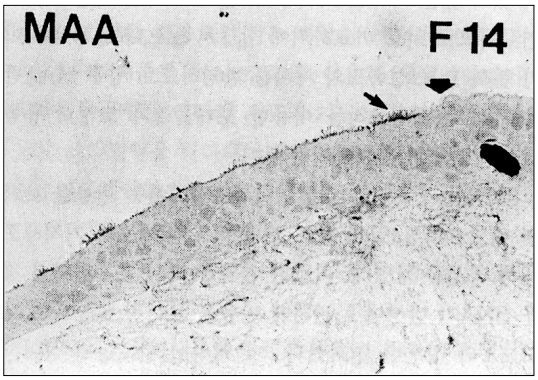

Fig. 7. MAA binding patterns. MAA shows inhomogeneously positive reactions on the floating fourteenth day. The positive reaction(thin arrow) and negative reaction(thick arrow) are noted(×400).

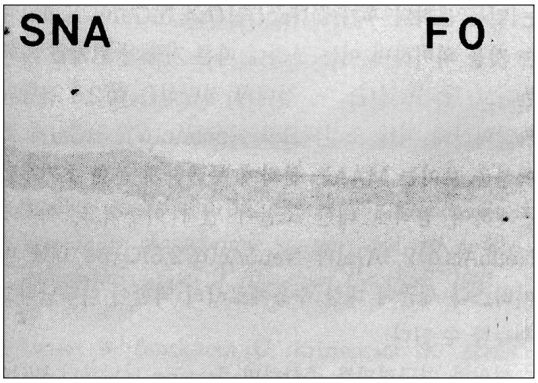

Fig. 8. SNA binding patterns. SNA shows negative reaction to all cells on the floating zero day(×200).

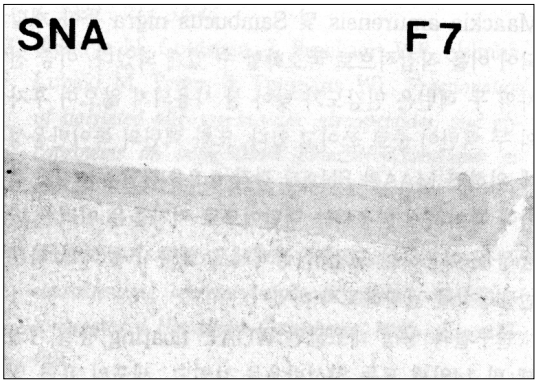

Fig. 9. SNA binding patterns. SNA shows negative reaction to all cells on the floating seventh day(×200).

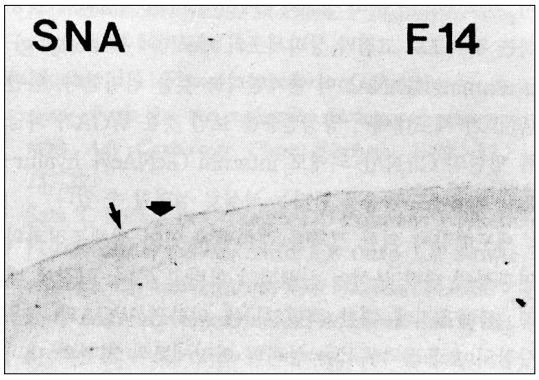

Fig. 10. SNA binding patterns. SNA shows inhomogeneously positive reaction on the floating fourteenth day. The positive reaction(thin arrow) and negative reaction(thick arrow) are noted(×200).

3. SNA의 면역조직화학 염색소견

SNA는 floating 당일, 7일째까지 음성반응을 보였고, 14일째 양성반응을 보였다. floating 당일소견으로 음성 반응이었으며(Fig. 8), floating 7일째 역시 음성반응이었다(Fig. 9). Floating 14일째 SNA는 섬모, 분비 상피세포 및 기저세포에서 양성 반응을 보였으나 비균일적인 반응이었다(Fig. 10).

고 찰

코점막의 방어기전중 씨알릭산은 코점막의 일차 방어기전에 관여하는 중요한 기능을 하고 있으며, 최근 조직학 및 조직화학적 연구에 의하면 당단백질내 씨알릭산의 감소는 병적인 상태를 반영한다고 한다[13)14)]. 이러한 연구결과로 미루어 씨알릭산이 생리적으로 중요한 역할을 담당하며, 아울러 씨알릭산에 대한 연구가 코점막의 방어기전 및 생리현상을 이해하는데 중요하다 하겠다.

씨알릭산의 국소화에 대한 연구로 이에 특이적 결합을 하는 렉틴인 Limulus polyphemus, Limax flavus, Maackia amurensis 및 Sambucus nigra 등이 개발되어 이를 직접적으로 국소화할 수 있게 되었다. 이중 전자의 두 렉틴은 민감도가 낮아 잘 사용되지 않

으며 후자의 두 렉틴이 주로 쓰이고 있다. 또한 렉틴의 특이반응성에 의하면 MAA와 SNA가 각각 α 2,3 결합과 α 2,6 결합에 특이하게 반응하는 렉틴이므로 저자들은 이러한 반응성을 이용하여 코점막 상피세포 배양시 분화에 따른 반응양상을 관찰하고자 하였다.

연구결과 양성 대조군인 WGA는 floating 당일, 7일째 및 14일째 모두 양성반응을 보였고, 세포의 표면 및 세포내에서도 양성반응을 보였다. 세포 표면에서 양성반응을 보이는 것은 미분화된 상태에선 편평상피양 세포에서, 분화후에는 분비 상피세포에서 분비된 씨알릭에 반응하는 것이므로 코점막 상피세포의 세포막에 N-acetyl glucosamine(GlcNAc)이 존재한다는 것을 의미한다. 한편 WGA가 세포내에서 양성반응을 보인 것은 WGA가 과당류 말단의 GlcNAc 외에도 internal GlcNAc와 hyaluronic acid에도 반응을 한다는 사실로 설명할 수 있다[11].

세포배양에 의한 결과를 해석함에 있어 생체조직과의 연관성에 대한 분석이 선행되야 한다고 본다. 이점에 대해, 생체조직에 대한 렉틴연구에 의하면 WGA의 경우 사람의 호흡점막에서는 상피의 기저세포와 혈관의 내피세포에 약반응을, 선조직과 결체조직에 강반응을 보인다고 하였다[11]. 본 연구결과상 섬모 상피세포와 분비 상피세포에서 양성반응을 보였는데 두 결과를 단순히 비교하면 생체조직과는 다른 결과로 여겨질 수 있다. 그러나 세포배양의 경우 분비 상피세포만이 분화되고 배세포가 분화되지 않으며 선조직과 혈관조직이 포함되지 않으므로[15], 외견상의 결과로는 상이한 결과이나 세포배양의 특성을 고려하면 생체의 반응과 일치하는 것으로 생각된다. 즉, 생체에서 선조직에서 양성반응을 보이는 것은 세포배양의 경우 미분화시 편평상피양 세포나 분화후의 분비상피세포에 양성인 결과와 일치한다고 할 수 있다. 또한 생체에서 기저세포에 양성인 결과는 미분화시 편평상피양 세포의 경우 다능한(pluripotential) 세포이므로 합당한 결과이며, 분화후의 섬모 상피세포와 분비 상피세포의 경우 분비된 씨알릭산에 의해 양성 반응을 보이므로 생체와 같은 양상이라 여길수 있다고 생각된다. 이러한 사실로 본 실험을 통해 생체의 양상을 유추할 수 있다 하겠다.

MAA도 WGA와 유사하게 floating 당일, 7일째 및 14일째 전부에서 분화와 무관하게 양성반응을 보였다. 이러한 결과는 씨알릭산(Neu5Ac) 증에서도 Neu5Ac(α 2,3)Gal이 존재하며, 인체 기도 섬모 상피세포는 씨알릭산을 함유한다는 보고[4]와 일치한다 하겠다. 본 연구결과 분화에 무관하게 MAA가 양성반응을 보였지만 분화에 따라서는 상반된 연구결과가 존재한다. 즉, 백서 호흡점막의 경우 생후 1일까지는 전혀 반응이 없다가 생후 3일째부터 섬모에 양성반응을 보인다는 보고[11]가 있으며, 한편 같은 백서 호흡점막이라도 발생에 관계없이 양성반응을 전혀 보이지 않았다는 보고[15]가 있다. 두 연구 모두 백서에 대한 연구이므로 본 연구와는 종간의 차이가 있어 단순 비교는 어려우며, 분화가 아닌 발생에 대한 연구이므로 서로 비교하기에 합당치 않으나 발생의 차이가 분화 또는 성숙도의 차이를 반영하므로 향후 MAA반응에 대해 생체조직을 이용한 포매물질과 고정액 등을 달리한 연구가 필요하리라 본다.

SNA의 경우 floating 당일과 7일째에는 반응을 보이지 않았으며 14일째 섬모 및 분비 상피세포와 기저세포에서 양성을 보였다. 이러한 결과는 백서 호흡점막의 경우 SNA가 발생에 무관하게 반응을 보이지 않는다는 보고[11][15]와 상반된 결과였다. 이 역시 실험대상이 상이하여 단순 비교가 어려우므로 MAA와 같이 생체조직에 대해 포매물질과 고정액 등을 달리한 연구의 필요성을 의미한다 하겠다.

SNA의 경우 분화가 진행된 상태에서 양성을 보인다는 것은 분화의 후기에 Neu5Ac(α 2,6)Gal이 표현된다는 것을 의미하며 이는 분화에 따른 기능의 변화를 의미한다고 할 수 있다. 즉, 점액의 점탄성은 α 2,3 결합의 씨알릭산에 의해 조절되므로 Neu5Ac (α 2,3)Gal에 특이성을 보이는 MAA는 분화에 무관하게 분화 초기부터 존재하여 점액에 대한 조절이 먼저 이루어고, 이후에 Neu5Ac(α 2,3)Gal와 Neu5Ac(α 2,6)Gal에 대해 바이러스나 세균에 대한 수용체로서의 역할이 나타난다고 추측할 수 있다.

이러한 연구결과를 종합하면 floating 당일부터 WGA와 MAA가 양성을 보여 GlcNAc와 Neu5Ac(α 2,3)

Gal가 섬모 및 분비세포, 기저세포에 존재함을 알 수 있었으며, floating 14일째부터 SNA가 양성을 보여 이 때부터 Neu5Ac(α 2,6)Gal가 존재함을 알 수 있었다. 즉, 상기한 연구결과는 분화에 따라 씨알릭산의 발현이 다름을 증명하는 것으로 분화에 따른 기능의 차이를 나타낸다 하겠다.

MAA와 SNA의 반응이 균일하지 않았는데 이에 대해서는 분화에 따른 차이, 고정액에 따른 차이, 포매물질에 따른 차이 등으로 생각된다[15)16)]. 본 실험의 포매물질은 epon 812를 사용하였으므로 렉틴반응에 가장 민감한 것으로 알려진 Lowicryl K4M을 이용한 연구가 필요하리라 본다.

Floating법을 이용한 세포배양법은 형태학적으로 분화가 되어 세포의 모양을 관찰하기에는 좋은 방법이나 과연 세포의 기능을 반영하는 가에 의문이 들었다. 본 실험결과를 고찰한 결과 분비되는 씨알릭산이 분화에 따라 차이가 나기 때문에 floating법을 이용한 세포배양법이 형태학적 유용성뿐 아니라 세포의 기능적 측면을 반영할 수 있는 배양법임을 나타내어 추후 분자생물학적 연구에 유용한 세포배양법으로 사료되었다.

결 론

사람 코점막 상피세포의 분화에 따른 씨알릭산의 발현이 분화시기에 따라 차이가 나므로, 분화에 따라 발현되는 씨알릭산이 다르다는 것을 알 수 있었으며, 이러한 발현의 차이는 조직의 기능 유지에 따른 우선순위의 차이로 생각되었다. 일부 염색반응이 비균일적이므로 이에 대해 향후 Lowicryl K4M를 포매물질로 이용한 연구가 필요하리라 생각된다.

References

1) Bradley A, Schulte BA, Spicer SS : *Histochemical methods for characterizing secretory and cell surface sialoglycoconjugates. J Histochem Cytochem. 1985 ; 33 : 427-438*
2) Lundh B, Brockstedt U, Kristensson K : *Lectin binding pattern of neuroepithelial and respiratory epithelial cells in the mouse nasal cavity. Histochemical J. 1989 ; 21 : 33-43*
3) Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peters B, Peumans WJ : *Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized Elderberry (Sambucus nigra L) Bark Lectin. Arch Biochem Biophys. 1987 ; 254 : 1-8*
4) Schulte BA, Spicer SS : *Histochemical methods for characterizing secretory and cell surface sialoglycoconjugates. J Histochem Cytiochemc. 1985 ; 33 : 427-438*
5) Suzuki Y, Nagao Y, Kato H, Suzuki T, Matsumoto M, Murayama J : *The hemagglutinin of the human influenza viruses A and B recognize different receptor microdomains. Biochemica Biophysica Acta. 1987 ; 903 : 417-424*
6) Montreuil J : *Primary structure of glycoprotein glycans : Basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv Carbohydr Chem Biochem. 1980 ; 37 : 157-223*
7) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J : *Detection of the Neu 5Ac(α 2,3) Gal(α 1,3) GlcNAc sequence with leukoagglutinin from Maackia amurensis : Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in α 2,3- and α 2,6- linkage. J Histochem Cytochem. 1989 ; 37 : 1577-1588*
8) Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peters B, Peumans WJ : *The elderberry (Samnucus nigra L) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2, 6) Gal/GalNAc sequence. J Biol Chem. 1987 ; 262 : 1596-1601*
9) Taatjes DJ, Roth J, Peumans W, Goldstein IJ : *Elderberry. bark lectin-gold techniques for the detection of Neu5Ac(α 2,6) Gal/GalNAc sequences : Applications and limitations. Histochem J. 1988 ; 20 : 478-490*
10) Wang WC, Cummings RD : *The immobilized leukoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked 2,3 to penultimate galactose residues. J Biol Chem. 1988 ; 263 : 4576-4585*
11) Kwon OH, Yoon JH, Kim KS, Lee JG : *Expression of sialic acids in the epithelium of developing murine nasal cavity. Korean J Rhinol. 1994 ; 1(1) : 48-53*
12) Lee JG, Yoon JH, Kim YH, Kim KS, Choi JW, Kim CH : *Distribution of sialoconjugates and*

their penultimate sugar in developing murine olfactory and respiratory mucosa. Korean J Otolaryngol. 1995 ; 38 (7) : 1042-1048

13) Lim DJ, Coticchia JM, Ueno K, Heiselman FA, Bakaletz LO : *Glycoconjugates in the chinchilla tubotympanum. Ann Otol Rhinol Laryngol. 19 91 ; 100 : 933-943*

14) Mygind N : *Applied physiology of the nose. In : Mygind M, Frankland AW. Nasal allergy. Oxford : Alden Press, 1979 : 39-56*

15) Lee JG, Yoon JH, Lee MH, Park IY : *Differentiation of human nasal epithelial cells (HNEC) by floating method-A scanning electron microscopic study. Korean J Otolaryngol. 1995 ; 38 (9) : 1326-1335*

16) Kim KS, Lee JG, Yoon JH, Park IY, Moon HJ : *Lectin-binding patterns with endothelial cells of murine respiratory and olfactory mucosa. Korean J Rhinol. 1996 ; 3 (1) : 24-29*